

BESTIMMUNG
DER PHOSPHATIDYLCHOLIN-
KONZENTRATION IM SERUM
DES RINDES WÄHREND DES ZYKLUS

Marcio Ricardo Costa Dos Santos



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. M. Rüsse

**BESTIMMUNG DER PHOSPHATIDYLCHOLIN-KONZENTRATION
IM SERUM DES RINDES WÄHREND DES ZYKLUS**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Marcio Ricardo Costa Dos Santos
aus
Niterôí, RJ / Brasilien

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. M. Rüsse

Korreferent: Prof. Dr. H.P. Jennissen

Tag der Promotion: 25. Juli 1986

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen
Austauschdienstes.

Meinen Eltern

und

Patricia

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG.....	1
2. LITERATUR.....	2
2.1. Synthese und Abbau von Azetylcholin.....	3
2.2. Speicherung und Freisetzung von Azetylcholin	11
2.3. Mögliche Zusammenhänge zwischen Phosphatidyl- cholin und der Reproduktion.....	12
3. MATERIAL UND METHODEN.....	21
3.1. Tiermaterial.....	21
3.2. Methodik.....	21
3.3. Bestimmung von Phosphatidylcholin im Serum..	22
3.3.1. Herstellung des Serums.....	22
3.3.2. Testprinzip.....	23
3.3.3. Reagentien und Geräte.....	26
3.3.4. Arbeitsdurchführung.....	27
4. ERGEBNISSE.....	29
Verlauf des endogenen Serum-Phosphatidylcho- linspiegels während des Zyklusgeschehens....	29
5. DISKUSSION.....	36
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	39
7. SUMMARY.....	40
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	41

LEBENSLAUF

1. EINLEITUNG

In der modernen Rinderhaltung stellen endokrin bedingte Fortpflanzungsstörungen ein erhebliches Problem dar. Über die Bedeutung des Azetylcholin im Hinblick auf die Regulation des Endokriniums ist bislang wenig bekannt.

Mehrere wissenschaftliche Untersuchungen der letzten Jahre ergeben Hinweise darauf, daß die Synthese einiger Neurotransmitter durch die Gabe ihrer chemischen Vorstufen gesteigert werden kann.

So liegen für die Phosphatidylcholine als Ausgangssubstanzen für die Biosynthese des Azetylcholins Ergebnisse vor, die bei Psychosen des Menschen zeigten, daß die Gabe dieser Vorläufersubstanzen bestimmte Nebenwirkungen von Psychopharmaka mildern können.

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es zu klären, ob im Serum von Kühen während des Zyklus Schwankungen der Phosphatidylcholin-Konzentration meßbar sind, die eventuell für die Zyklusregulation bedeutsam sein können.

2. LITERATUR

Die neuroendokrine Regulation der Fortpflanzung unterliegt der Beeinflussung sowohl exterozeptiver Reize, die über die Großhirnrinde und extrahypothalamische Strukturen wie das limbische System, Epiphyse und Area präoptica den Hypothalamus erreichen, als auch enterozeptiver Reize über das vegetative Nervensystem. Die Weiterleitung dieser Signale im Nervensystem erfolgt im wesentlichen auf chemischem Wege über neuronal gebildete Botenstoffe (Neurotransmitter). Ein wichtiger Neurotransmitter im Säugetierorganismus ist das Azetylcholin.

Azetylcholin zählt neben Adrenalin, Noradrenalin und Serotonin zu den am längsten bekannten Neurotransmittern (LOEWI, 1921). Azetylcholin kommt sowohl an zentralen und spinalen Synapsen, als auch bei der ganglionären Erregungsübertragung im peripheren vegetativen Nervensystem als Überträgerstoff vor. An allen präganglionären Neuronen des Sympathikus wie auch des Parasympathikus und an den postganglionären Nervenendigungen des Parasympathikus dient Azetylcholin als chemischer Vermittler der nervalen Erregungsübertragung. Im Gehirn sind die höchsten Konzentrationen von Azetylcholin in den Basalganglien Putamen, Nucleus caudatus, Pallidum und Corpus amygdaloideum und im Thalamus, d.h. in den entwicklungsgeschichtlich älteren Gehirnteilen, zu finden. Mit Ausnahme des Corpus amygdaloideum, das zum Riechhirn im weiteren Sinne gehört, bilden die übrigen Basalganglien wich-

tige Bestandteile des extrapyramidalen Systems, das an allen Bewegungsvorgängen entscheidend beteiligt ist (SCHEUNERT u. TRAUTMANN, 1976).

Die spezifische Wirkung von Azetylcholin als Überträgerstoff an postganglionären Nervenendigungen des Parasympathikus auf autonom innervierte Organe ist vielfältig und sehr differenziert. Die Wirkungen der Neurotransmitter im Sympathikus und Parasympathikus auf vegetativ innervierte Organe sind mit wenigen Ausnahmen antagonistischer Natur. So kann beispielsweise Azetylcholin die Wirkung freigesetzten Noradrenalins postsynaptisch antagonisieren und gleichzeitig präsynaptisch dessen Freisetzung hemmen. Diese Hemmung der Noradrenalinfreisetzung durch Azetylcholin wurde bisher am Herzen, an den Gefäßen und im Zentralnervensystem nachgewiesen (GREEF u. WIRTH, 1983).

2.1. Synthese und Abbau von Azetylcholin

FERNSTROM und WURTMAN (1977) haben beobachtet, daß Gehirneuronen Azetylcholin aus zwei Vorläufern synthetisieren, und zwar aus Cholin und Azetylcoenzym A. Diese Reaktion ist durch Cholinazetyltransferase katalysiert. Die Autoren fanden heraus, daß im Rattengehirn die Azetylcoenzym A-Konzentration und die Cholin-Konzentration unter dem Sättigungsgrad von Cholinazetyltransferase liegt. Sie schliessen daraus, daß nach Aufnahme einer mit Cholin angereicherten Nahrung parallel dazu Veränderungen in der Azetylcholin-Synthese und

-Freisetzung auftreten können. Hieraus entwickelten sie die Hypothese, daß Cholin im Blut auch die Vorläufersubstanz für die Azetylcholin-Synthese im Gehirn ist und daß der Cholin-transport vom Blut ins Gehirn daher in einem linearen Zusammenhang mit der Cholin-Konzentration im Serum steht.

LABELLA und SHIN (1968) untersuchten die Aktivität der Enzyme Cholinazetyltransferase und Cholinesterase aus homogenisierten Hypophysen und Epiphysen geschlachteter Rinder und verglichen die Aktivität dieser Enzyme mit der aus homogenisierten Rattengehirnen. Aus ihren Ergebnissen geht hervor, daß die Konzentration dieser Enzyme im Hypophysenvorderlappen, im Hypophysenhinterlappen und in der Epiphyse des Rindes niedriger als bei Ratten ist. Darüber hinaus fanden sie heraus, daß die Konzentration sowohl der Cholinazetyltransferase als auch der Cholinesterase beim Rind im Hypophysenvorderlappen geringer ist als im Hypophysenhinterlappen. Daraus schließen die Autoren, daß die Hypophyse beim Rind nur wenige Neurone mit Azetylcholin als Neurotransmitter enthält.

Nach BLUSZTAJN et al. (1979) wird Cholin im Nucleus caudatus des Rindergehirns durch Methylierung von Phosphatidylethanolamin synthetisiert. Dabei wird zuerst Phosphatidylcholin gebildet. ANSELL und SPANNER (1972, 1979) sind der Meinung, daß Cholin im Gehirn durch die Methylierung nicht resynthetisierbar ist und deshalb ersetzt werden muß. Möglicherweise entstammt das gesamte Cholin aus Serum-Phospholipiden. Es wird von der kleinen Menge an freiem Cholin im

Blut oder von einer endogenen Quelle (Phosphatidylcholin) geliefert, die ständig über Resorption aus der Nahrung aufgefüllt wird (DOMINO et al., 1983; ANDERSON u. JOHNSTON, 1983).

In ähnlicher Weise könnte der Cholin-Rest für die Azetylcholin-Synthese direkt von dem an Phospholipid gebundenen Cholin freigesetzt werden, wenn es in die Gehirneuronen eindringt (JENDEN, 1979; ZEISEL, et al., 1979). Dadurch wird Phosphatidylcholin zur Cholin-Hauptquelle, um die "Anforderungen" für die Azetylcholin-Synthese zu erfüllen.

Das Cholin wird an der Blut-Hirn-Schranke aus dem Blut durch die Membran der Nervenzelle ins Zytoplasma geschleust und beeinflusst konzentrationsabhängig den Grad der Azetylcholin-Synthese im Gehirn. Faktoren, die die Intensität des Cholin-Transportes vom Blut zum Gehirn steuern, spielen in der Regulation des cerebralen Azetylcholin-Metabolismus eine wichtige Rolle. Zwei dieser Faktoren, die den Cholin-Fluß zum Gehirn kontrollieren, können die Plasmakonzentration und die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke sein (PARDRIDGE et al., 1979).

Das im Blut zirkulierende Cholin wird zum Teil in der Leber aus Glycerophosphaten synthetisiert, und zum Teil (ca. 40 - 50%) mit der Nahrung aufgenommen. Die Ausgangsprodukte des Cholins in der Nahrung sind die Phosphatidylcholine (Lezithine). Phosphatidylcholin ist ein wichtiges Phospholipid

in Nerven- und Leberzellen. Es kommt vorwiegend in Zellmembranen vor. Die endogene Synthese von Phosphatidylcholin (PC) kann in Organen wie Leber, Niere, Lunge und Gehirn stattfinden (ZEISEL et al., 1979).

Chemisch ist Phosphatidylcholin ein L-Glycerin-3-Phosphorsäureester, der am Phosphatrest (R_3) mit Cholin verestert ist. Die beiden anderen Reste R_1 und R_2 symbolisieren je nach Herkunft des Lezithins die verschiedenen angelagerten Fettsäuren - vor allem Palmitin-, Arachidon- oder Linolensäure. Höhere Konzentrationen von Phosphatidylcholin findet man im Eidotter, Ölsamen (Soja, Erdnuß, Sonnenblumen und Raps), in Hefen und anderen Einzellern (FERNSTROM, 1981; UGRINOVITS, 1983).

WURTMAN und FERNSTROM (1976) haben das Vorkommen von Cholin in Nahrungsmitteln mit dem Vorkommen des Neurotransmitters Azetylcholin (Ach) im Gehirn verglichen. Die Autoren konnten zeigen, daß die perorale Verabreichung von Cholin bei Ratten zu einer Steigerung der Azetylcholin-Synthese in Nervenzellen führt. Weiterhin wurde nachgewiesen, daß Phosphatidylcholin bei der Behandlung bestimmter Erkrankungen des Menschen, effektiver als Cholin war (WURTMAN et al., 1977). Die Ursache für die Steigerung der Syntheserate sehen die Autoren darin, daß das an das Phosphatidylcholin gebundene Cholin durch die Darmbakterien nicht vollständig in Trimethylamin umgewandelt wird. Auf diese Weise kann die Cholinkonzentration im Blut ansteigen und so zur vermehrten Azetylcholin-Synthese führen.

Bei einem Teil des mit der Nahrung aufgenommenen Phosphatidylcholins werden im Dünndarm durch die Phospholipasen A und B die angelagerten Fettsäuren R_1 und R_2 abgespalten, wodurch Lyssolezithin entsteht. Dieses ist gut wasserlöslich, wird resorbiert und in den Mukosazellen des Dünndarms wiederum mit Fettsäuren zur Synthese von neuem Phosphatidylcholin verwendet. Ein Teil des aufgenommenen Phosphatidylcholins wird jedoch weiter abgebaut und die Reste in anderen Synthesevorgängen verwendet (KOSTNER u. HOLASEK, 1983).

In einer Übersicht faßten WURTMAN et al. (1981) die bis dahin bekannt gewordenen Ergebnisse der Neurotransmitter-Synthese aus ihren Vorläufersubstanzen zusammen. Bestimmte Neurone sind danach imstande, spezifische Neurotransmitter in Abhängigkeit von der Plasmakonzentration des Vorläufers zu produzieren. Die Autoren sind der Auffassung, daß verschiedene Vorläufer der Neurotransmitter-Synthesen keine oder eine nur geringe biologische Aktivität aufweisen. Deshalb erscheint es möglich, daß eine mit einem spezifischen Vorläufer angereicherte Nahrung die Synthese eines bestimmten Neurotransmitters beeinflussen kann. Bei cholinreicher Nahrung oder Verabreichung von Phosphatidylcholin steigt die Cholin-Konzentration im Blut an, wodurch der Cholin-Transport ins Gehirn erhöht wird. Die ansteigende Cholin-Konzentration im Gehirn kann somit zu einer Steigerung der Azetylcholin-Synthese führen.

Für den Transport von Cholin sind zwei unterschiedliche Systeme verantwortlich. Eines ist zuständig für den Transport des Cholins vom Blut ins Gehirn über die Blut-Hirnschranke. Dieses hat für Cholin eine geringe Affinität. Es ist somit in der Lage, über erhöhte Serum-Cholin-Konzentration einen erhöhten Gehirn-Cholin-Spiegel zu erreichen, da es durch den physiologischen Serum-Cholin-Spiegel nicht gesättigt wird. Der Serum-Cholin-Spiegel ist somit direkt proportional zum Gehirn-Cholin-Spiegel. Aus diesem Grund kann man die Werte der Cholin-Konzentration im Gehirn durch Messung der Serum-Cholin-Konzentration ermitteln.

Das zweite Transportsystem in den cholinergen Nervenendigungen hat eine hohe Affinität für Cholin. Durch den Recycling-Mechanismus wird Azetylcholin durch die Azetylcholinesterase gespalten und das frei gewordene Cholin über Azetyltransferase mit Coenzym A resynthetisiert. Dieser Mechanismus ist durch physiologische Serumwerte gesättigt. Somit ermöglicht vermehrte Cholin-Zufuhr über das "Niedrig -Affinitäts-System" eine vermehrte Aufnahme von Cholin ins Gehirn.

Aus experimentellen Untersuchungen von WURTMAN (1982) geht hervor, daß die Vorläufer-Substanzen verschiedener Neurotransmitter die Blut-Hirnschranke in spezifischer Weise passieren. Dabei konkurrieren Vorläufer wie Tyrosin, Tryptophan und andere elektrisch neutrale Aminosäuren miteinander um die gleichen Trägermoleküle in den Kapillarwänden. Cholin hingegen beansprucht für die Passage der Blut-Hirnschranke

ein eigenes Trägermolekül. Die Cholin-Moleküle werden aus der Blutkapillare des Nervensystems im Gehirn in die Endigungen cholinergner Neuronen (Endköpfchen der präsynaptischen Nervenzelle) direkt aufgenommen und dort mit Hilfe des Enzyms Cholinazetyltransferase aus Cholin und Azetylcoenzym A zu Azetylcholin aufgebaut und in Vesikeln deponiert. Sobald die Nervenzelle erregt wird, wird Azetylcholin in den synaptischen Spalt ausgeschieden.

Der Abbau des Azetylcholins zu Cholin und Essigsäure erfolgt durch die spezifische, strukturgebundene Azetylcholinesterase und die unspezifische, aus dem Blut stammende Cholinesterase. Die Azetylcholin-Spaltung ist mit einer Inaktivierung gleichzusetzen, da Cholin 10000 - 100000mal weniger wirksam ist als Azetylcholin. Die Essigsäure wird auf dem Blutweg abtransportiert, während der größte Teil des Cholins wieder in das cholinerge Neuron aufgenommen wird und der Resynthese von Azetylcholin dient (GREEF u. WIRTH, 1983) (Abb. 1).

CAT - Cholinazetyltransferase

AChE - Azetylcholinesterase

Ac-CoA - Azetylcoenzym A

Ac-Ch - Azetylcholin

Ch - Cholin

Na⁺ - Natrium

K⁺ - Kalium

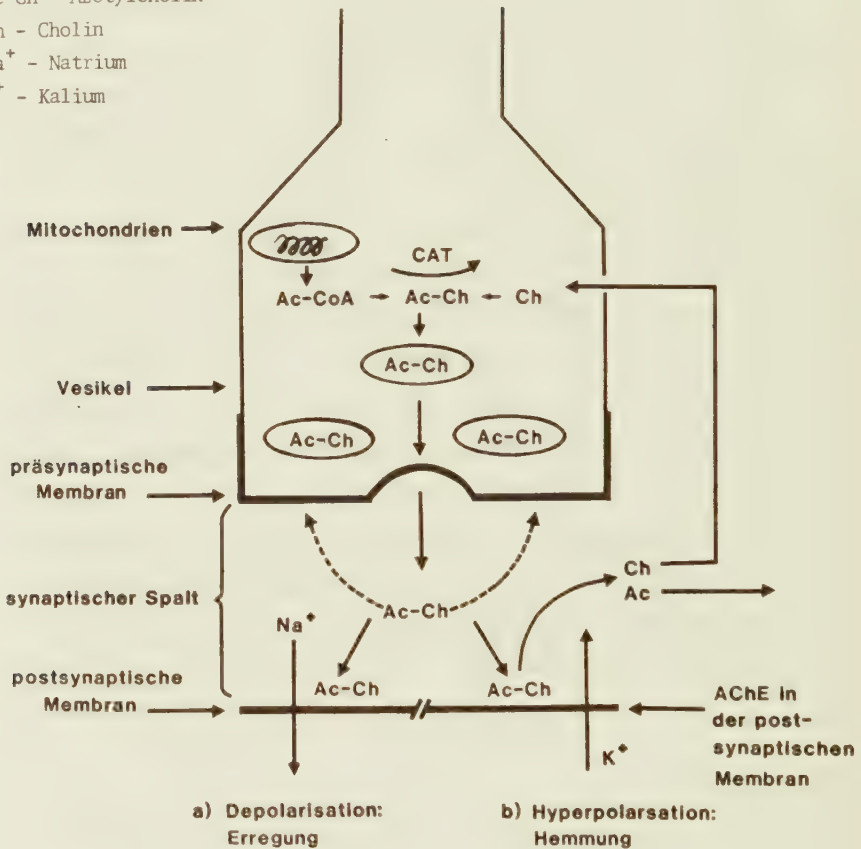


Abb. 1: Synthese, Speicherung und Freisetzung von Azetylcholin in parasympathischen Nervenendigungen, nach GREEF und WIRTH (1983).

2.2. Speicherung und Freisetzung von Azetylcholin

Der größte Teil des synthetisierten Azetylcholins wird in Vesikeln der Neurone gespeichert. Bei der Erregungsübertragung wird Azetylcholin durch Exocytose in den synaptischen Spalt abgegeben. Dabei spielen Calcium-Ionen (Ca^{++}) eine wichtige Rolle. GREEF und WIRTH (1983) nehmen an, daß während der Exocytose der gesamte Inhalt eines oder mehrerer Vesikel mit jeweils etwa 1000 Azetylcholin-Molekülen als Ganzes in den synaptischen Spalt entleert wird, d.h. es reagiert immer ein bestimmtes Quantum an Azetylcholin-Molekülen mit den Rezeptoren der postsynaptischen Membran. Die Verbindung zwischen Azetylcholin und den postsynaptischen Rezeptoren führt zur Änderung der postsynaptischen Membran-Permeabilität für Kationen (Na^+ , K^+ , Ca^{++}). Nach Zunahme der Leitfähigkeit der nachgeschalteten Zellen für Natrium kommt es in diesen zur Depolarisation und nach Überschreitung eines Schwellenpotentials zur Auslösung eines Aktionspotentials. Durch Erhöhung der Kaliumleitfähigkeit wird die postsynaptische Membran hyperpolarisiert, d.h. das Ruhepotential stabilisiert. Diese Wirkung (Hemmung) tritt z.B. an den Schrittmacherzellen des Herzens auf (GREEF u. WIRTH, 1983).

2.3. Mögliche Zusammenhänge zwischen Phosphatidylcholin und der Reproduktion

ROBERTS (1971) wies auf die Bedeutung der Ernährung als Ursache von Fortpflanzungsstörungen beim Rind hin. Seiner Meinung nach können sowohl eine Unterernährung als auch eine Überernährung unter anderem zu einem Sistieren der Ovarfunktion beitragen. Außerdem stellt der Autor heraus, daß beispielsweise ein Proteinmangel fast immer mit einer Phosphorunterversorgung verbunden ist.

Eine Energieunterversorgung kann über die Herabsetzung des Grundumsatzes die Ursache für eine Ovardystrophie sein (MORROW, 1969 und 1980). Die Energieunterversorgung ist unter anderem auf den Mangel an Glycerophosphat, Phospholipiden und phosphorilierten Fettsäuren im Futter zurückzuführen. Ein derartiger Mangel beeinflusst die Eierstocksfunktion direkt (BACHLER, 1982; ECHTERNKAMP et al., 1982; STURM, 1983; RÜSCH, 1985).

So ist es vorstellbar, daß die Energieunterversorgung eine Erklärung für die Ursache des Corpus luteum persistens sein könnte, da die Luteolyse über Prostaglandin $F_2\alpha$ vom Angebot an Fettsäuren abzuhängen scheint (JÜCHLE u. LAMOND, 1980).

Nach VERGROESEN (1979) bewirkt die Stimulation verschiedener Zellen von Tieren eine Aktivierung der Phospholipase A_2 , die die Fettsäure an die zweite Position der phospho-

lipiden Zellmembran transportiert. Die Stimulation kann mechanisch, chemisch, hormonal oder durch das Nervensystem erfolgen, wobei der Neurotransmitter Azetylcholin eine Rolle spielen soll. Wenn Arachidonsäure oder Dihomo- γ -linolsäure freigesetzt wird, können diese durch Cyclooxygenase (Prostaglandin-Synthetase) über Endoperoxidase zu verschiedenen Prostaglandinen oder Tromboxanen umgewandelt werden. Darüber hinaus wird durch Lipoxygenase eine bestimmte Menge der freigesetzten Fettsäuren in 12-Hydroxy-Fettsäuren umgewandelt. Alle genannten Substanzen sind hochaktiv und beeinflussen physiologische Vorgänge.

Nach VERGROESEN (1979) kann angenommen werden, daß die Prostaglandine, Tromboxane und 12-Hydroxy-Arachidonsäure in den physiologisch negativen Feedbacksystemen eine Rolle spielen. Der Autor beobachtete außerdem, daß in verschiedenen Zellen die PG-Biosynthese durch Ansteigen oder Absinken der Konzentration der benötigten Fettsäure-Vorläufer und der Linolensäure beeinflusst wird. Diese Fettsäuren-Vorläufer kommen u.a. in Pflanzen wie Mais, Sojabohnen, Sonnenblumenkernen, Reisschalen und Weizenkeimöl vor.

Der Ausgangsstoff für die oben erwähnten Fettsäuren sind nach ZEISEL et al. (1979) die Phosphatidylcholine. Nach den Angaben von HORTON (1972) produzieren Zellen nach entsprechender Stimulierung im zentralen Nervensystem verschiedene Prostaglandine bzw. $\text{PGF}_2\alpha$. Bekannte Wirkungen von Prostaglandinen im Gehirn sind beispielsweise Sedation,

Tranquilisation, Analgesie und Verringerung der Katecholamine. Die $\text{PGF}_2\alpha$ -Synthese steuert die Rückbildung des Gelbkörpers.

Das Fortpflanzungsgeschehen beim Rind wird durch neuroendokrine Vorgänge im Hypothalamus-Hypophysensystem und den Gonaden gesteuert, steht aber auch in enger Verbindung mit den Funktionen anderer Drüsen. Endogene und exogene Reize erreichen über das limbische System die Area präoptica und supraoptica des Hypothalamus (McDONALD, 1980). In Abhängigkeit von der Art der ankommenden Reize wird im Nucleus hypothalamicus ventromedialis und im Nucleus infundibularis (oder arcuatus) das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) gebildet und freigesetzt. In dieser Regulation spielen Neurotransmitter, wie z.B. Azetylcholin, Noradrenalin, Dopamin und Serotonin bei der synaptischen Erregungsübertragung eine Rolle.

Bereits 1941 applizierten TAUBENHAUS und SOSKIN eine Mischung von Azetylcholin und Prostigmin - einem Parasympathomimetikum, das die Enzym-Cholinesterase hemmt - direkt in die Hypophyse von Ratten. Nach dieser Behandlung trat bei den Tieren nach den Befunden von Vaginalabstrichen eine Scheinträchtigkeit ein. Diese Ergebnisse interpretierten die Autoren dahingehend, daß die applizierte Mischung die Freisetzung von LH aus dem Hypophysenvorderlappen stimuliert.

Nach Untersuchungen von JUSTO et al. (1975) besteht die Möglichkeit, daß Azetylcholin-Behandlung im Gehirn von Ratten die Freisetzung von LH stimuliert. Dieser Effekt konnte bei Prostigmin beschleunigt und bei Atropin blockiert werden. Die Autoren vermuten, daß der Neurotransmitter Azetylcholin an den, die Freisetzung von Gonadotropin-Releasing-Hormon steuernden Mechanismen vor allem im Hypothalamus oder in der Eminentiae medialis teilnehmen kann.

Untersuchungen von GIORGUEFF et al. (1977) haben gezeigt, daß Azetylcholin die LH- und Prolaktin-Freigabe nach Stimulierung von tuberoinfundibularen Dopamin stimulieren kann. Diese Untersuchungen führten zu der Annahme, daß Azetylcholin die Bildung von Dopamin in anderen Gehirnstrukturen erhöht. Ein weiterer Zusammenhang zwischen Azetylcholin und der Freisetzung des Corticotropin-Releasing-Faktors (CRF) geht aus Untersuchungen von HILLHOUSE et al. (1975) hervor. In der Eminentiae medialis ist eine relativ große Menge von Azetylcholin vorhanden (McGEER u. McGEER, 1979).

Atropin blockiert die pulsatile Sekretion des Gonadotropin-Releasing-Hormons während des Östrus nach Steroidbehandlung (LIBERTUN u. McCANN, 1973) und nach elektrischer Stimulation in der Area präoptica des Hypothalamus von Ratten (KALRA u. KALRA, 1974). Aus diesen Befunden schließen die Autoren, daß der Neurotransmitter Azetylcholin vermutlich an der Freigabe des LH beteiligt ist (KORDON et al., 1982).

Nach FERNSTROM (1981) kann die Blutkonzentration bestimmter Vorläufer die Synthese von Neurotransmittern in Neuronen beeinflussen. So soll die Bildung verschiedener Neurotransmitter im Gehirn über die Nahrungsaufnahmebeeinflusst werden können. Als Vorläufersubstanz des Azetylcholins wurde Phosphatidylcholin zu therapeutischen Zwecken bei der Behandlung bestimmter Erkrankungen des Menschen eingesetzt. So konnte beispielsweise bei Patienten, die wegen Psychosen mit Psychopharmaka behandelt wurden, Nebenwirkungen in Form des dyskinetischen Syndroms mit Phosphatidylcholin-Gaben gemildert werden (GROWDON, 1979; WURTMAN, 1982). Die Erklärung dieses Phänomens sehen die Autoren darin, daß die Cholin-Konzentration in den Gehirnneuronen die Rate der Azetylcholin-Synthese beeinflusst (JENDEN, 1979).

SCALLY et al. (1978) haben beobachtet, daß die orale Cholin-Behandlung bei Ratten die Adrenalin-Konzentration im Urin steigert. Dieser Effekt kommt wahrscheinlich durch die Erhöhung der Katecholamin-Freisetzung aus den Nebennieren bei Erreichen einer Cholin-Konzentration von 20 mmol/kg, zustande. Nach Denervierung der Nebenniere war diese Reaktion nicht mehr nachweisbar. Hinweise, die die Einflußnahme von Azetylcholin auf die Katecholamin-Freisetzung geben, gehen aus den Untersuchungen von KIDOKORO (1984) hervor. Der Autor hat eine Steigerung der Adrenalin-Freisetzung bei Ratten nach Stimulierung der Nebennieren-Chromaffinzellen mit Azetylcholin beobachtet.

Nach peroraler Cholin-Verabreichung beobachteten HIRSCH und WURTMAN (1978) eine Steigerung der präsynaptischen Azetylcholin-Konzentration und eine Erhöhung der cholinergen Erregungsübertragung in den präganglionären Synapsen des sympathischen Nervensystems. GROWDON und WURTMAN (1979) verabreichten Ratten eine hohe Dosis Cholin und fanden danach einen Anstieg von Cholin und Azetylcholin im Nebennierenmark. Zwei Stunden nach der Cholin-Behandlung (60 mg/kg i.p.) beobachteten sie eine Aktivitätssteigerung der Tyrosinhydroxylase im Striatum um 25%; dieser Effekt war dosisabhängig und konnte durch eine Vorbehandlung mit Atropin blockiert werden. Die Cholin-Behandlung beschleunigte dabei über die Aktivierung der Tyrosinhydroxylase bei mit Dopa-Decarboxylaseblocker vorbehandelten Tieren auch die Umwandlung von Tyrosin zu Dopa.

Nach WALKER (1984) scheint bei weiblichen Ratten der erste Schritt bei der Synthese des Dopamins durch Hydroxilation von Tyrosin zu Dopa ein hemmender Faktor für den Synthes Ablauf zu sein. Dabei kann Azetylcholin durch seinen physiologisch stimulierenden Einfluß auf die Tyrosinhydroxylase in der Regulation der Gonadotropinsekretion eine Rolle spielen.

OWASOYO (1982) untersuchte die Aktivität des Enzyms Cholinazetyltransferase im Gehirn (Cortex cerebri, Cerebellum, Hypothalamus, Hypocampus, Corpus amygdaloideum, Mesencephalum, Pons und Medullae oblongata) bei ovariectomierten

Ratten. Diese Tiere waren mit Östradiol und Progesteron vorbehandelt. Der Autor beobachtete, daß Östrogene die Aktivität von Cholinazetyltransferase in den untersuchten Gehirnregionen nicht beeinflußt. Andererseits erhöhte Progesteron die Enzymaktivität in der Großhirnrinde, im Hypocampus und Mandelkern. Aus den Untersuchungsergebnissen geht hervor, daß in bestimmten Gehirnregionen Veränderungen der Enzymaktivität von den Sexualhormonen abhängig sind.

LAKOMY et al. (1984) untersuchten histologisch die cholinerge Innervation von Ovarien des Schweines unter Berücksichtigung der Azetylcholinesterase-Aktivität während des Zyklus. Aus der Beobachtung, daß eine relativ hohe Anzahl von Nervenfasern mit Azetylcholinesterase-Aktivität in den Ovarien vorkommt, äußern die Autoren die Vermutung, daß zwischen der Aktivität der Azetylcholinesterase in den Ovarien und der Hormonsynthese ein Zusammenhang besteht. LAKOMY et al. (1984) sind deshalb der Meinung, daß cholinerge Nerven nicht alleine die Funktion der Gefäße sondern auch die endokrinen Funktionen der Ovarien beeinflussen können.

Im Gehirn von Schweinen haben auch ADEJUNO und EGBUNIKE (1984) die Aktivität des Enzyms Azetylcholinesterase untersucht. Die Ergebnisse deuten an, daß nach Gonadektomie die Aktivität dieses Enzyms in verschiedenen Gehirnstrukturen wie beispielsweise Mandelkern, Mittelhirn und Hinterhirn unterdrückt wird. Andererseits haben die Autoren bei diesen Tieren nach Steroid-Behandlung (Testosteron) eine Erhöhung

der Azetylcholinesterase-Aktivität beobachtet. ADEJUNO und EGBUNIKE (1984) nehmen an, daß die cholinerge Aktivität im Gehirn Steroid-abhängig sein könnte.

SIMPSON et al. (1985) untersuchten die Aktivität des Enzyms Cholinazetyltransferase im Gehirn (Pars distalis, Area präoptica und Striatum) von adulten Ratten. Die Autoren beobachteten, daß nur in der Pars distalis die Aktivität dieses Enzyms während des Zyklus in unterschiedlicher Konzentration nachzuweisen ist. Das geringste Niveau konnte im Östrus gemessen werden. Die genaue Lokalisation des Enzyms in der Pars distalis und seine Bedeutung während des Östruszyklus ist jedoch noch unklar. Die Aktivität von Cholinazetyltransferase bleibt in der Area präoptica und im Striatum während des Zyklus konstant.

Da die Konzentration der Cholinazetyltransferase in der Pars distalis während des Östrus niedrig ist, besteht die Möglichkeit, daß die cholinerge Aktivität in der Pars distalis von der Cholinazetyltransferase-Aktivität abhängig ist. Die Autoren beobachteten außerdem, daß die Enzym-Aktivität vom Cholin-Angebot abhängig ist. Schließlich vermuteten SIMPSON et al., (1985), daß die Fluktuation der Cholinazetyltransferase-Aktivität im Zusammenhang mit der Cholinazetyltransferase-Steroid-sensibilität (OWASOYO, 1982) der Pars distalis gesehen werden kann und so eine Rolle bei der Kontrolle der hypophysealen Hormonfreisetzung spielen könnte.

Offensichtlich spielt Azetylcholin , neben den Katecholaminen und vermutlich auch anderen Neurotransmittern bei der Kontrolle der Gonadotropinsekretion eine Rolle.

Über die Bedeutung des Neurotransmitters Azetylcholin im Fortpflanzungsgeschehen des Rindes liegen bisher keine Daten vor. Es sollte daher zunächst geprüft werden, in welcher Größenordnung die Serum-Konzentration von Phosphatidylcholin beim Rind liegt und ob im Ablauf des Zyklus Veränderungen meßbar sind.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Tiermaterial

Für die Untersuchungen standen elf Kühe der Rasse Deutsches Fleckvieh im Alter von 3 - 3 1/2 Jahren zur Verfügung. Die Tiere hatten 60 - 80 Tage vor Versuchsbeginn komplikationslos gekalbt. Die Aufstallung der Tiere erfolgte auf Stroheinstreu in Anbindehaltung. Sie wurden mit Heu ad libitum und Kraftfutter (Millikorn der Fa. Zentz, Feldmoching) gefüttert und erbrachten eine tägliche Milchleistung von 12 - 17 l /Kuh.

3.2. Methodik

Der Funktionszustand der Ovarien wurde durch zweimal wöchentlich durchgeführte rektale Untersuchung ermittelt und registriert. Bei mehreren Tieren wurde eine Ultraschall-Untersuchung der Ovarien mit einem Gerät der Firma Linus Fischer Ultrasound, Schottland, vorgenommen. Die Ultraschall-Befunde dienten der Kontrolle der rektalen Befunderhebung.

Bei einer Kuh erfolgte die Zyklusinduktion durch viertägige intravenöse Applikation von 4 g Tyrosin in 1 l physiologischer Kochsalzlösung (WETZEL, 1985). Nach der Behandlung wurde das Tier täglich viermal auf äußerliche Östrus Symptome hin beobachtet und täglich einmal eine rektale Untersuchung durchgeführt. Während der folgenden 99 Tage wurden

klinisch fünf regelmäßige Sexualzyklen (21 ± 1 Tage) verfolgt, täglich eine Blutprobe aus der Vena jugularis gewonnen und die Phosphatidylcholin-Konzentration im Serum gemessen.

Bei zehn Kühen wurde eine PRID-Spirale intravaginal gelegt (BUKOWSKI, 1982). Die PRID-Spirale wurde nach 12 Tagen entfernt. Nach der Entnahme wurden die Tiere täglich viermal auf äußerliche Brunstsymptome hin beobachtet und täglich einmal eine rektale Untersuchung durchgeführt.

Die Blutentnahmen aus der Vena jugularis erfolgten einmal täglich um 10.00 Uhr vier Tage vor und am Tage der Entfernung der Spirale, danach fünf Tage lang in 24stündigen Abständen. Zur Trennung des Serums wurden die Blutproben 10 Minuten in einer Kühlzentrifuge bei 7000 G zentrifugiert.

3.3. Bestimmung von Phosphatidylcholin im Serum

3.3.1. Herstellung des Serums

Die Bestimmung der Phosphatidylcholin-Konzentration im Serum wurde mittels der "enzymatischen UV-Test-Combination Lezithin" von Boehringer Mannheim GmbH (Best.Nr. 274119) durchgeführt.

3.3.2. Testprinzip

Die enzymatische Methode für die Phosphatidylcholin-Bestimmung im Serum wird mittels einer Brechung der Ketten, der Isolierung des anorganischen Phosphors und des Radikal-Cholins vorgenommen, das aus dem Phosphatidylcholin kommt. Phosphatidylcholin (PC) wird insbesondere bei pH 8,0 durch Phospholipase C (PL-C aus *B. cereus*) in Diglycerid und Phosphorylcholin (Cholin-P) gespalten. In Gegenwart von alkalischer Phosphatase (AP) wird Phosphorylcholin weiter zu anorganischem Phosphat und Cholin hydrolisiert.

Nach Inaktivierung der alkalischen Phosphatase durch Kochen, wird Cholin in der durch Cholinkinase (Chol-K) katalysierten Reaktion durch Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu Phosphorylcholin phosphoryliert, wobei Adenosin-5'-diphosphat (ADP) gebildet wird. Mittels Pyruvatkinase (PK) wird das entstandene ADP durch Phosphoenolpyruvat (PEP) unter Bildung von Pyruvat wieder in ATP übergeführt.

Das hierbei entstandene Pyruvat wird dann durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) in Gegenwart von Lactatdehydrogenase (LDH) zu Lactat hydriert, wobei NADH zu NAD oxidiert wird (Abb. 2).

Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Cholinmenge, also der Phosphatidylcholinmenge äquivalent; NADH ist die Meßgröße und wurde durch Spektralfotometrie-Absorption nach der von BEUTLER und HENNIGER (1981) beschriebenen Methode bestimmt.

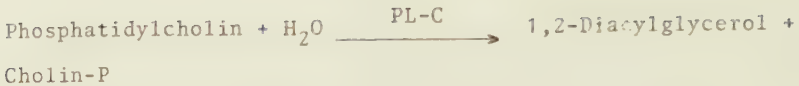


Abb. 2: Testprinzip

Die Konzentration von jeder Probe wird durch die Formel

$$C = \frac{V1 \cdot V2 \cdot MG \cdot F}{E \cdot v1 \cdot v2 \cdot d \cdot 1000} \cdot \Delta E$$

in mg/ml bestimmt, wobei C = Konzentration, V1 = Inkubationsvolumen, V2 = Testvolumen, v1 = Probevolumen, v2 = Entnahmenvolumen, MG = Molekulargewicht (733), F = Verdünnungsfaktor, E = Extinktionskoeffizient, d = Schichtdicke der Kuvette, $\Delta E = \Delta RL - \Delta Ep$, ΔRL = Reagentien-Leerwertsdifferenzen, ΔEp = Probe Extinktionsdifferenzen (Abb. 3).

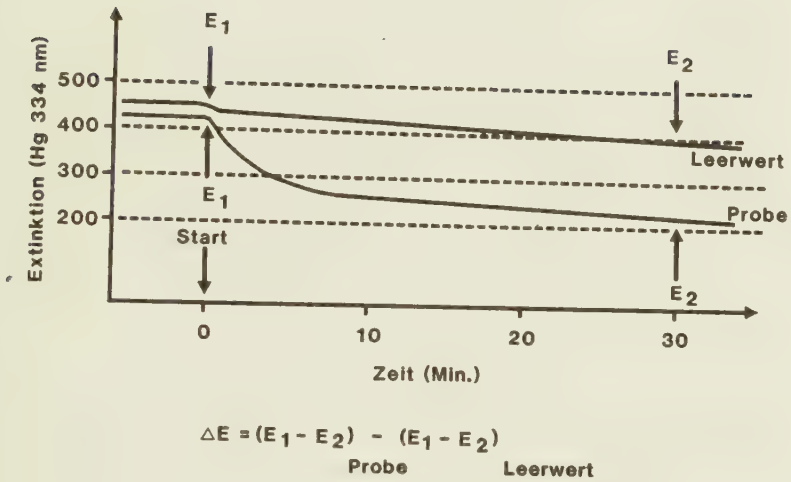


Abb. 3: Reaktionsverlauf der Phosphatidylcholin-Bestimmung
im Serum von Kühen bei 344 nm.

3.3.3. Reagentien und Geräte

Die Test-Combination setzt sich aus folgenden Reagenten zusammen:

Lösung 1 - Borax-Puffer (200 mmol/l, pH 8,0) und
Magnesiumsulfate (10 mmol/l).

Suspension 2 - Alkaline Phosphatase ($\geq$ 100 U/ml) und
Phospholipase-C ($\geq$ 80 U/ml).

Lösung 3 - Nicotinamid-adenin-dinucleotid (2,8 mmol/l),
Adenosin-5'-triphosphat (13 mmol/l) und
Phosphoenolpyruvat (5 mmol/l).

Suspension 4 - Pyruvat-Kinase ($\geq$ 300 U/ml) und
Lactat-Dehydrogenase ($\geq$ 300 U/ml).

Suspension 5 - Choline Kinase ($\geq$ 2,0 U/ml).

Für die Qualitätskontrolle wurde das "Precilip E.L. Kontrollserum von Boehringer Mannheim GmbH (Best.Nr. 225053/225061) und für die Phosphatidylcholin-Standardkurve die L-Dipalmitoylphosphatidylcholin (synth. 98% pure) von Sigma Chemical Co - BRD (Best.Nr. PO763) herangezogen.

Die Messung der Extinktionsänderung der Enzymreaktion wurde mit einem "Eppendorf-Spektral Photometer 1101M" bei der Wellenlänge von 334 nm in Halbmikroküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Die Meßbühne des Photometers war an den Kreislauf eines Wasserbades angeschlossen, das auf 25° C erwärmt war.

3.3.4. Arbeitsdurchführung

Zur Herstellung des Probenmaterials wurden 0,1 ml Serum mit 10 ml aqua dest. verdünnt und gemischt. Parallel zu jeder zehnten enzymatischen Bestimmung wurde ein Reagentien-Leerwert mit aqua dest. durchgeführt.

Die enzymatische Bestimmung wurde wie folgt durchgeführt:

1 ml Lösung 1 wurde mit 0,05 ml Suspension 2 und danach mit 1 ml Probenmaterial (Serum 1/100) in einem Spitzbodenzentrifugenglas mit dem Mixer vermengt und anschließend 20 Minuten im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Im Anschluß daran wurde das Probenglas für 5 Minuten in ein zweites Wasserbad mit 95°C gehalten. Danach wurde die Probe innerhalb von 10 Minuten in einem weiteren Wasserbad auf 25°C abgekühlt. Der so behandelten Serumsprobe wurden 0,10 ml Lösung 3 und 0,02 ml Suspension 4 zugesetzt. Das Ganze wurde gemischt und 10 Minuten bei 740 G zentrifugiert.

Zur Messung der Phosphatidylcholin-Konzentration wurde vom Überstand des Zentrifugates 1,5 ml in eine Halbmikroküvette gegeben und die Extinktion 1 (E_1) gemessen. Anschließend wurde dem Zentrifugat 0,05 ml Suspension 5 zugefügt und mehrmals gemischt, 30 Minuten bei einer Temperatur von 25°C gehalten und erneut gemischt. Nach dieser Behandlung erfolgte die Messung der Extinktion 2 (E_2) mit anschließender Bestimmung des Reagentien-Leerwertes.

Alle Proben wurden unter denselben Bedingungen gemessen. In der Regel wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei die

Abweichung weniger als 3% betrug. Der Meßbereich, in dem sich Phosphatidylcholin im Serum nachweisen läßt, ist bis zu einer Konzentration von 5 mg/ml linear. Bei jeder Untersuchung wurde eine Eichkurve erstellt, um etwaige Fehlerquellen bei der Arbeitsdurchführung auszuschließen (Abb. 4).

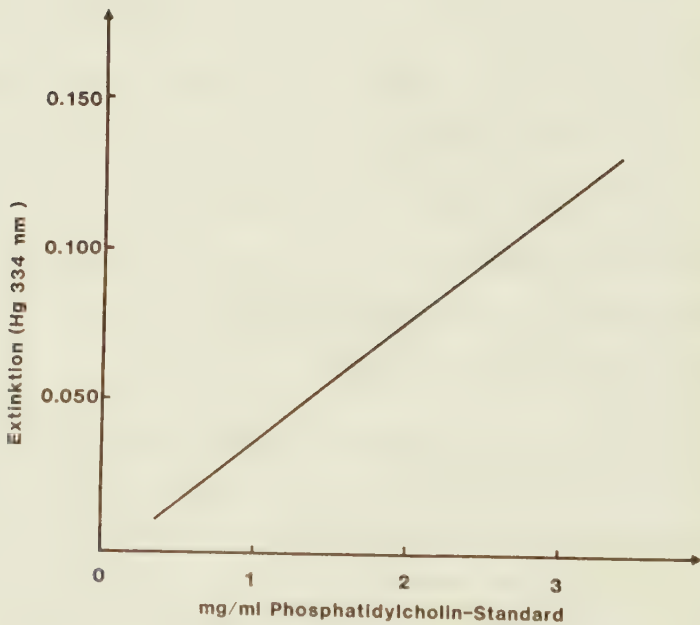


Abb. 4: Eichkurve

Zur Signifikanzprüfung der Mittelwertsdifferenzen wurde der Student T-Test verwendet.

4. ERGEBNISSE

Verlauf des endogenen Serum-Phosphatidylcholinpiegels während des Zyklusgeschehens.

Bei der ersten Versuchskuh wurde im Ablauf von 99 Tagen täglich die Phosphatidylcholin-Konzentration im Serum bestimmt. Während des Untersuchungszeitraumes zeigte das Tier fünf deutliche Östren im Abstand von 21 ± 1 Tagen. In Abbildungen 5 (a-b) sind die täglich ermittelten Phosphatidylcholin-Konzentrationen in Verbindung mit dem Tag des Östrus angegeben.

In Abbildung 6 sind die Mittelwerte ($\bar{x} \pm s$) der Meßdaten der fünf Zyklen graphisch dargestellt. Der Mittelwert aller Daten ($\bar{x} \pm s$) ist in der Graphik durch die obere und untere gebrochene Linie markiert. Aus den dargestellten Kurven lassen sich die Schwankungen der Phosphatidylcholin-Konzentration im Verlauf des Zyklusgeschehens ablesen. Auffallend ist ein regelmäßig auftretender Phosphatidylcholin-Anstieg vom Proöstrus ($1,230 \pm 0,46$ mg/ml) bis zum Tag des Östrus ($1,642 \pm 0,47$ mg/ml), dann ein deutlicher Abfall des endogenen Phosphatidylcholin-Blutspiegels ($0,873 \pm 0,40$ mg/ml) am Metöstrus. Während des Diöstrus schwanken die Phosphatidylcholin-Konzentrationen um einen Mittelwert von $1,249 \pm 0,33$ mg/ml.

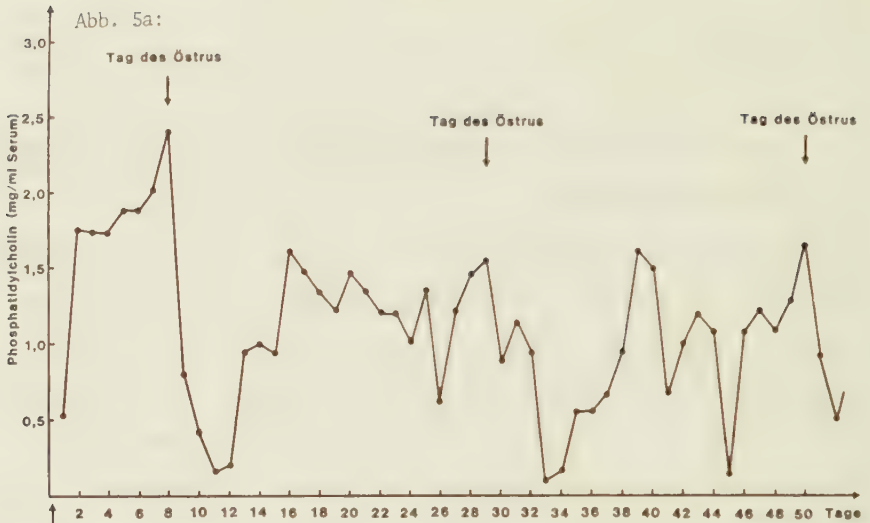


Abb.5(a-b): Verlauf der Serum-Phosphatidylcholin-Konzentration einer Kuh im Ablauf von fünf Zyklen. Auf der Ordinate ist die Phosphatidylcholin-Konzentration, auf der Abszisse die Zeitdauer von 0 - 99 Tagen dargestellt.

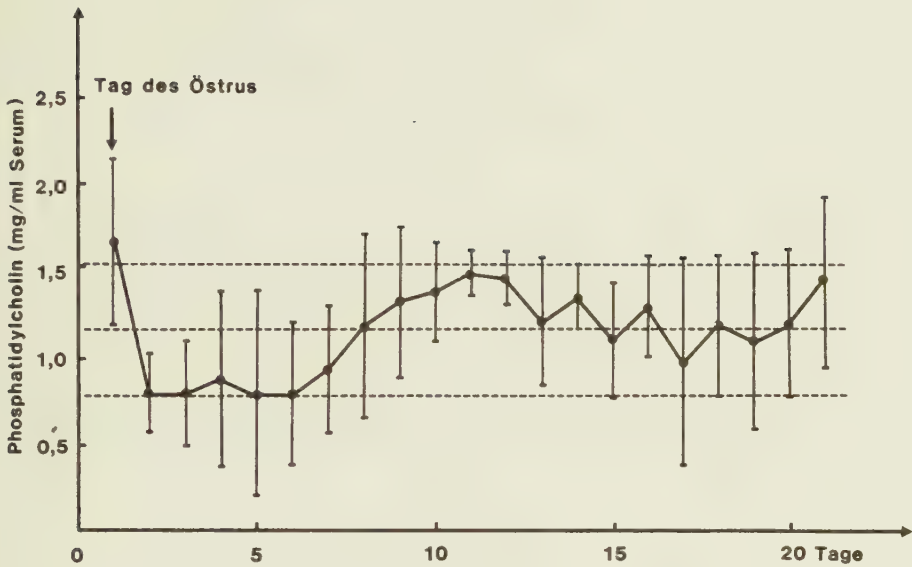
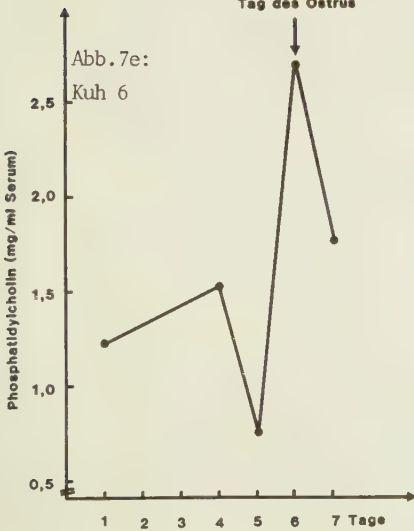
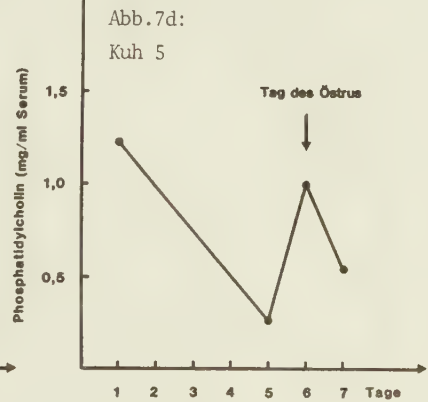
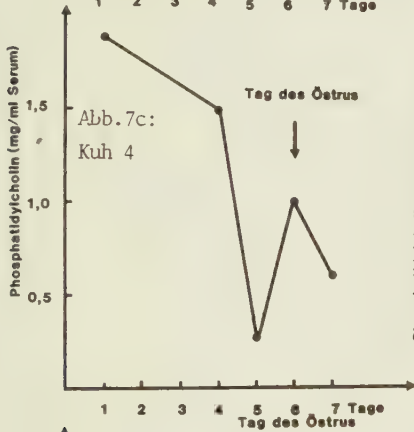
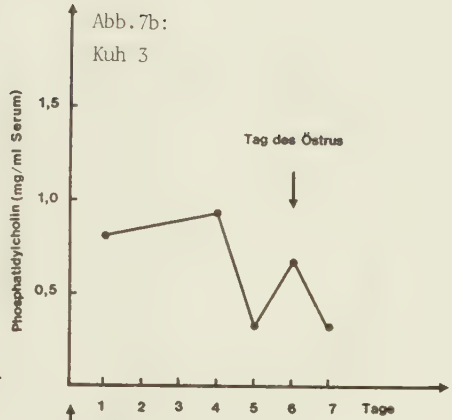
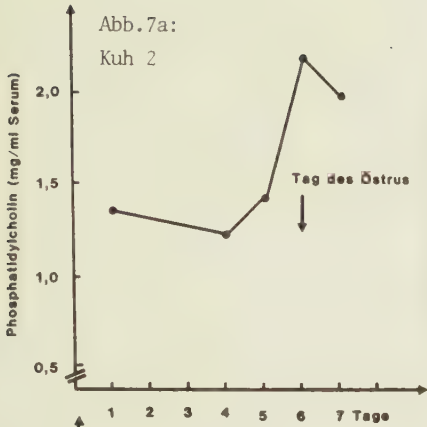


Abb. 6: Mittelwerte ($\bar{x} \pm s$) der Phosphatidylcholin-Konzentration im Blutserum einer Kuh während fünf regelmäßiger Zyklen.

Bei zehn Kühen, bei denen zur Zyklusinduktion eine PRID-Spirale intravaginal appliziert wurde, wurden weitere Phosphatidylcholin-Konzentration-Bestimmungen vorgenommen. Die Meßdaten der Phosphatidylcholin-Konzentration im Serum der Tiere sind in Abbildung 7a bis 7j dargestellt.

Abbildung 8 gibt die Mittelwerte ($\bar{x} \pm s$) der Phosphatidylcholin-Konzentration dieser in Abbildung 7 (a-j) einzeln dargestellten Serumwerte an. Bei denjenigen Kühen, bei denen im Proöstrus mehr als eine Phosphatidylcholin-Bestimmung durchgeführt wurde, ging das arithmetische Mittel aus den vorhandenen Proöstrus-Werten in die Berechnung der Mittelwerte aller zehn Kühe ein.

Aus den dargestellten Kurven läßt sich bei allen Kühen wiederum ein steiler Anstieg der Phosphatidylcholin-Werte von Proöstrus ($0,707 \pm 0,44$ mg/ml) bis Östrus mit Maximalwerten ($1,389 \pm 0,73$ mg/ml) ablesen, dem ein deutlicher Abfall der Phosphatidylcholin-Konzentration folgt ($1,017 \pm 0,62$ mg/ml). Außerdem ist bei diesen Tieren eine abfallende Tendenz des endogenen Phosphatidylcholins im Serumspiegel von Entnahme der PRID-Spirale bis Proöstrus-Beginn zu beobachten.



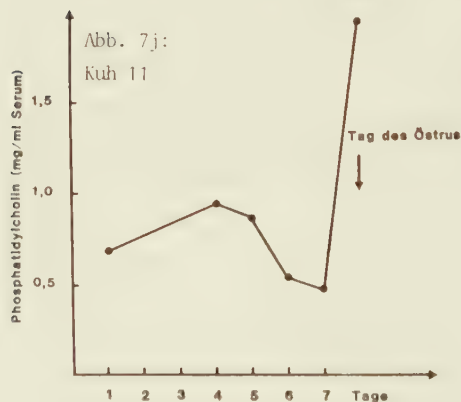
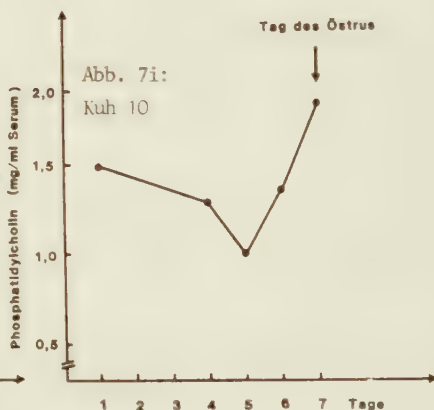
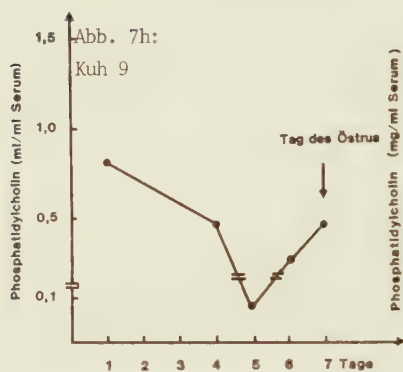
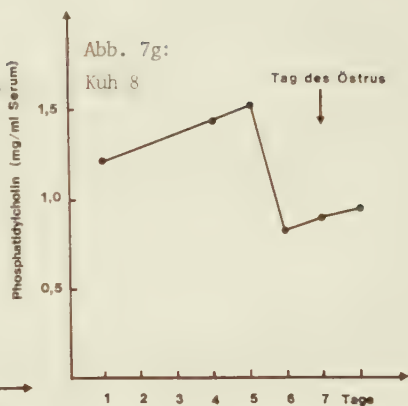
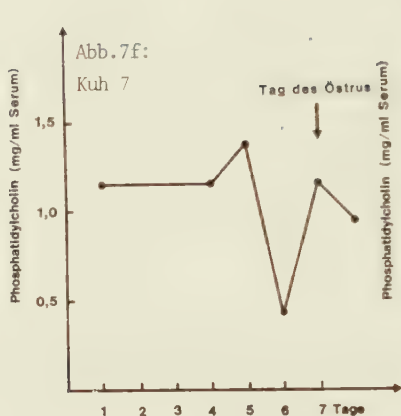


Abb. 7a bis 7j: Verlauf der endogenen Phosphatidylcholin-Konzentration bei 10 Kühen, die mit PRID-Spirale behandelt wurden.

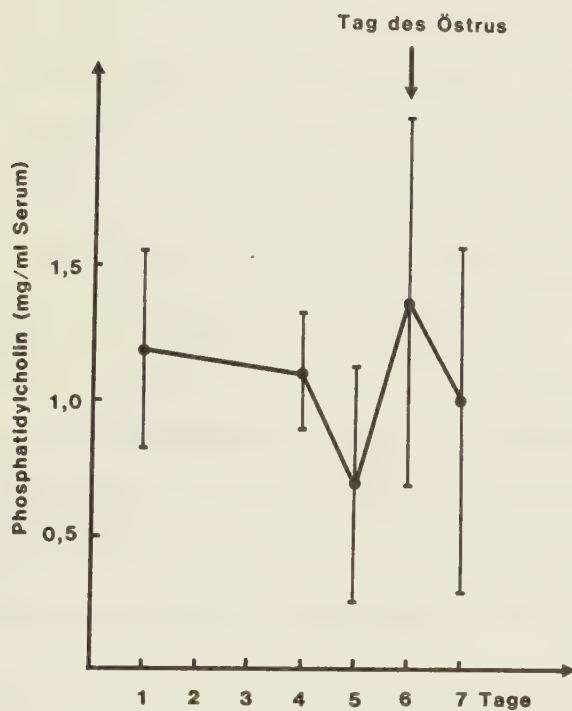


Abb. 8: Mittelwerte ($\bar{x} \pm s$) der Phosphatidylcholin-Konzentration im Blutserum von 10 Kühen aus Abbildung 7a bis 7j.

5. DISKUSSION

Die Ergebnisse der Phosphatidylcholin-Bestimmungen im Serum von Kühen zeigen, daß Konzentrationsunterschiede mit dem Zyklusverlauf korreliert sind.

Bei einer Kuh wurde über den Zeitraum von fünf Zyklen täglich die Phosphatidylcholin-Konzentration im Serum bestimmt. Die durchschnittliche Phosphatidylcholin-Konzentration betrug im Proöstrus 1,230 mg/ml Serum. Im Östrus konnte ein Anstieg auf 1,642 mg/ml Serum gemessen werden ($p = 0,01$). Anschließend erfolgte im Metöstrus ein Absinken des Phosphatidylcholins auf 0,873 mg/ml Serum ($p = 0,05$). Im folgenden Diöstrus wurden Schwankungen der Phosphatidylcholin-Konzentration um den Durchschnittswert von 1,249 mg/ml Serum gemessen ($p = 0,05$).

Da die erste Untersuchung gezeigt hatte, daß beim Rind die Bestimmung der Phosphatidylcholin-Konzentration im Serum vor, während und nach der Brunst typische Schwankungen aufweisen, wurde bei zehn Kühen weitere Messungen in diesem Zeitraum vorgenommen. Um eine vergleichbare Ausgangssituation zu erreichen, erhielten die Tiere zunächst eine PRID-Spirale intravaginal gelegt. Die Spirale wurde jeweils 12 Tage später entfernt und anschließend die Zyklusinduktion durch rektale Befunderhebung an den Ovarien verfolgt.

Unter der Wirkung der PRID-Spirale (60 mg Medroxyprogesteron/Tag) hatten die Tiere eine Phosphatidylcholin-Konzentration von 1,186 mg/ml Serum. Nach Entnahme der Spirale fielen die Werte bei der proöstrischen Anbildung eines Follikels auf 0,786 mg/ml Serum ($p = n.s.$). Nach Beginn des Östrus konnte ein Anstieg auf 1,389 mg/ml Serum gemessen werden ($p = 0,01$). Nach der Ovulation im Metöstrus sank die Phosphatidylcholin-Konzentration im Serum der Tiere auf 1,017 mg/ml Serum ab. ($p = n.s.$).

Interessant erscheint die Tatsache, daß die Phosphatidylcholin-Konzentration im Serum östrischer Kühe ansteigt und mit dem von WETZEL (1985) beschriebenen Anstieg des L-Tyrosins korreliert ist. Diese Beobachtung spricht dafür, daß in der neuroendokrinen Regulation des Zyklus außer den Katecholaminen auch Azetylcholin eine Rolle spielen kann.

In der präovulatorischen Phase des Zyklus scheint ein erhöhter Bedarf an Phosphatidylcholin zu bestehen, der seinen Ausdruck im Anstieg der Serum-Konzentration findet. Der Abfall der Phosphatidylcholin-Werte im Serum nach dem Östrus könnte damit zusammenhängen, daß nunmehr vermehrt Phosphatidylcholin aus dem Blut zur Azetylcholin-Synthese herangezogen wird.

Der im Vergleich zum normalen Zyklus stärkere Abfall der Phosphatidylcholin-Konzentration im Serum der Tiere nach Entfernung der PRID-Spirale läßt vermuten, daß die Phospha-

tidylcholin-Konzentration von den Sexual-Steroidhormonen beeinflusst wird. Der Abfall nach der Spiralen-Entnahme könnte somit der Effekt des Progesteronentzuges sein, der anschließend durch die beginnende Östrogensynthese im heranwachsenden Follikel kompensiert wird. Über die Bedeutung der beobachteten Schwankungen der Phosphatidylcholin-Konzentration im Serum von Kühen während des Zyklus können bisher keine Angaben gemacht werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Bei elf nicht trächtigen Rindern wurde mittels der enzymatischen UV-Test-Combination Lezithin die Phosphatidylcholin-Konzentration während des Zyklus im Serum bestimmt.

Der Durchschnittswert aller Bestimmungen beträgt $1,144 \pm 0,36$ mg/ml Phosphatidylcholin. Vom Durchschnittswert ausgehend wurde bei den Tieren ein im Proöstrus mit $1,230 \pm 0,46$ beginnender, den höchsten Wert erreichender Anstieg auf $1,642 \pm 0,47$ mg/ml Phosphatidylcholin gemessen. Im Metöstrus trat zunächst ein Absinken auf $0,873 \pm 0,40$ mg/ml und anschließend im Diöstrus das Einpendeln auf den Durchschnittswert von $1,249 \pm 0,33$ mg/ml Phosphatidylcholin im Serum ein.

Die Schwankungen der Serum-Konzentration von Phosphatidylcholin als Vorläufersubstanz der Azetylcholin-Synthese korreliert mit der Serumkonzentration verschiedener Aminosäuren, die bei Neurotransmitter-Synthesen eine Rolle spielen.

7. SUMMARY

Endogeneous serum Phosphatidylcholine concentration determination in cattle during the oestrus cycle.

Serum Phosphatidylcholine concentration levels of non-pregnant cows were determined during the oestrus cycle using the "Enzyme UV-Test-Combination Lecithine" method.

The average value of all determinations was $1,144 \pm 0,36$ mg/ml Phosphatidylcholine. Starting from the average value, animals in proestrus showed a Phosphatidylcholine concentration of $1,230 \pm 0,46$ mg/ml. During oestrus there was a rise of $1,642 \pm 0,47$ Phosphatidylcholine in the serum. In met-oestrus there was a lowering of value to $0,873 \pm 0,40$ mg/ml and thereafter in Dioestrus a deviation around the average value of $1,299 \pm 0,33$ Phosphatidylcholine in the serum.

The variations of serum concentration level of Phosphatidylcholine as the precursor of Acetylcholine synthesis correlate with the serum concentrations of various amino acids which are of importance in neurotransmitter synthesis.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- ANSELL, G.B. und S. SPANNER (1972): The metabolism of phosphatidylcholine in brain tissue.
Biochem. Soc. Symp. 35, 151-159
- ANSELL, G.B. und S. SPANNER (1979): Sources of choline for acetylcholine synthesis in the brain.
In: Barbeau, A, J.H. Growdon und R.J. Wurtman
(Hrsg.), Nutrition and the Brain 5, 35-46, Raven Press, New York
- ANDERSON, G.H. und J.L. JOHNSTON (1983): Nutrient control of brain neurotransmitter synthesis and function.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 61, 271-281
- ADEJUNO, D.O. und G.N. EGBUNIKE (1984): The effect of the weaning orchidectomy and testosterone on the acethylcholinesterase activity of porcine brain and hypophysis.
Proc. 10th int. Congr. Anim. Reprod. Art. Ins.
(June 10-14), 23, Urbana-Champaign
- BACHLER, G.E. (1982): Untersuchungen über den Anteil von Kühen mit Fruchtbarkeitsstörungen am Gesamtpatientengut der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie des Rindes der TiHo Hannover.
Diss. med. vet., Hannover
- BEUTLER, O. und G. HENNIGER (1981): Enzymatische Bestimmung von Lecithin.
Swiss Food 3 (12), 27-29

- BLUSZTAJN, J.K., S.J. ZEISEL und R.J. WURTMAN (1979): Synthesis of Lecithin (phosphatidylcholine) from phosphatidylethanolamine in bovine brain.
Brain Res. 179, 319-327
- BUKOWSKI, A. (1982): Behandlungsversuche an Rindern mit Ovardystrophie mit der PRID^R-Spirale (Abbovestrol^R).
Diss. med. vet. Hannover
- DOMINO, E.F., B.N. MATHEWS, S.K. TAIT und A. ORTIS (1983): Effects of oral phosphatidylcholine on mouse brain choline and acetylcholine.
Arch. int. Pharmacodyn. Ther. 265 (1), 49
- ECHTERNKAMP, S.E., C.L. FERRELL und J.D. RONE (1982): Influence of pre- and post-partum nutrition on LH-secretion in suckled post-partum heifers.
Theriogenology 18 (3), 283-295
- FERNSTROM, J.D. (1981): Effects of precursors on brain neurotransmitter synthesis and brain function.
Diabetologia 20, 281-289
- FERNSTROM, J.D. und R.J. WURTMAN (1977): Brain monoamines and reproductive function.
In: Roy O. Greeß (Hrsg.), Int. Rev. Physiol. Reprod. Pyhs. II, 13, 23-55, University Park Press, Baltimore

- GIORGUIEFF, M.F., M.L. LE FLOCH, J. GLOWINSKI und M.J.BESSON (1977): Involvement of cholinergic presynaptic receptors of nicotinic and muscarinic types in the control of spontaneous release of dopamine from striatal dopaminergic terminals in the rat. J. Pharmacol. exp. Ther. 200 (3), 535-544
- GREEF, K. und K.E. WIRTH (1983): Pharmakologische Beeinflussung der cholinergen Erregungsübertragung. In: Forth, W., D. Henschler und W. Rummel (Hrsg.) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 4. Aufl., S. 91-109, Bibliographisches Institut, Mannheim
- GROWDON, J.H. (1979): Neurotransmitter precursors in the diet: Their use in the treatment of brain diseases. In: Wurtman, R.J. und J.J. Wurtman (Hrsg.), Nutrition and the Brain, 3, 117-181 Raven Press, New York
- GROWDON, J.H. und R.J. WURTMAN (1979): Dietary influences on the synthesis of neurotransmitters in the brain. Nutr. Rev. 37 (5), 129-136
- HILLHOUSE, E.W., J. BURDEN und M.T. JONES (1975): The effects of various putative neurotransmitters on the release of corticotrophin releasing hormone from the hypothalamus of the rat in vitro. I- The effect of acetylcholine and noradrenaline. Neuroendocrin. 17, 1-11

- HIRSCH, M.J. und R.J. WURTMAN (1978): Lecithin consumption
increases acetylcholine concentration in rat brain
and adrenal gland.
Science 202, 223-225
- HORTON, E.W. (1972): Prostaglandins.
Springer Verlag, Berlin
- JENDEN, D.J. (1979): An overview of choline and acetylcholine
metabolism in relation to the therapeutic uses
of choline.
In: Barbeau, A., J.H. Growdon und R.J. Wurtman
(Hrsg.), Nutrition and the Brain 5, 13-24, Raven
Press, New York
- JÜCHLE, W. und D.R. LAMOND (1980): Control of reproductive
functions in domestic animals.
1. Aufl., 248 S., VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- JUSTO, G., M. MOTTA und L. MARTINI (1975): In vivo effects
of acetylcholine on LH secretion.
Experientia 31 (5), 598-600
- KALRA, S.P. und P.S. KALRA (1974): Effects of circulating oestra-
diol during rat estrous cycle on LH release following
electrochemical stimulation of preoptic brain or
administration of synthetic LRF.
Endocrin. 94(3), 845-851

- KIDOKORO, Y. (1984): Acetylcholine-induced potential fluctuations and underlying currents in rat adrenal chromaffin cells.
Fed. Proc. 43 (9), 2364-2367
- KORDON, C., A. ENJALBERT, M. HERY, P.I.J. BRAVO, W. ROTSZEJN UND M. RUBERG (1982): Role of neurotransmitters in the control of adenohipophyseal secretion.
In: Morgane, P. und J. Panksepp (Hrsg.), Handbook of the hypothalamus, vol. 2 - Physiology of the hypothalamus, 253-306, Marcel Dekker, Inc. New York und Basel
- KOSTNER, G. und A. HOLASEK (1983): Die Bedeutung der Phospholipide im Rahmen des Fettstoffwechsels und der Laboratoriums-Medizin.
Diagnostica Dialog 28 (3), 1-7
- LABELLA, F.S. und S. SHIN (1968): Estimation of cholinesterase and choline acetyltransferase in bovine anterior pituitary, posterior pituitary, and pineal body.
J. Neurochem. 15, 335-342
- LAKOMY, M., T. DOBOSZYNSKA, I. DYNAROWICZ, J. KOTWICA und A. ZASADOWSKI (1984): Changes of ACHE activity in ovarian nerves of pigs in different periods of the oestrus cycle: relationship to ovarian steroids.
Gegenbaurs morph. Jb. 130 (5), 719-731
- LIBERTUN, C. und S.M. McCANN (1973): Blockade of the release of gonadotropins and prolactin by subcutaneous or intraventricular injection of atropine in male and female rats.
Endocrin. 92 (6), 1714-1724

- LOEWI, O. (1921): Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 189, 239-242
- MCDONALD, L.E. (1980): Veterinary endocrinology and reproduction.
3. Aufl., Lea & Febiger, USA
- McGEER, P.L. und E.G. McGEER (1979): Central cholinergic pathways.
In: Barbeau, A., J.H. Growdon und R.J. Wurtman (Hrsg.), Nutrition and the Brain, 5, 177-199,
Raven Press, New York
- MORROW, D.A. (1969): Phosphorous deficiency and infertility in dairy heifers.
J. amer. vet. med. Ass. 154 (7), 761-768
- MORROW, D.A. (1980): Nutrition and fertility in dairy cattle.
Mod. vet. Pract. 61, 499-503
- OWASOYO, J.O. (1982): The influence of estradiol and progesterone on the choline acetyltransferase activity of rat brain.
Neuroendocrin. Lett. 4 (2), 61-65
- PARDRIDGE, W.M., E.M. CORNFORD, L.D. BRAUN und W.H. OLDENDORF (1979): Transport of choline and choline analogues through the blood-brain barrier.
In: Barbeau, A., J.H. Growdon und R.J. Wurtman (Hrsg.), Nutrition and the Brain 5, 25-34 Raven Press, New York

- ROBERTS, S.J. (1971): Veterinary obstetrics and genital disease.
Theriogenology, 2. Aufl., Published by the Autor,
Ithaca, NY
- RÜSCH, X. (1985): Fütterungsmängel in Allgäuer Grünlandbetrie-
ben und deren Auswirkungen auf die Fruchtbarkeit
beim Rind.
Diss. med. vet., München
- SCALLY, M.C., I.H. ULUS und R.J. WURTMAN (1978): Choline
administration to the rat increases urinary cate-
cholamines.
J. Neural Transmission 43, 103-112
- SCHEUNERT, A. und A. TRAUTMANN (1976): Lehrbuch der Veterinär-
Physiologie.
6. Aufl. von R. Bronsch, Paul Parey Verlag, Berlin,
Hamburg
- SIMPSON, J., I.J. WILLIAMSON und G. FINK (1985): Choline acetyl-
transferase activity in the pars distalis, preoptic
area and striatum during the rat estrous cycle.
Neuroendocrin. 40(5), 444-449
- STURM, H. (1983): Zur Steuerung der Zwischenkalbezeit beim
Rind durch Brunstinduktion mit Prostaglandinanaloga
vor dem 40. Tag post partum.
Diss. med. vet., München

- TAUBENHAUS, M. und S. SOSKIN (1941): Release of luteinizing hormone from the anterior hypophysis by an acetylcholine-like substance from the hypothalamic region. *Endocrin.* 29, 958-964
- UGRINOVITS, M. (1983): Zur Bestimmung von Lecithin in Lebensmitteln. *Alimenta* 22, 7-9
- VERGROESEN, A.J. (1979): Hypothesis for interactions between acetylcholine and prostaglandin biosynthesis: An Introduction.
In: Barbeau, A., J.H. Growdon und R.J. Wurtman (Hrsg.), *Nutrition and the Brain*, 5, 109-111 Raven Press, New York
- WALKER, R.F. (1984): Impact of aged-related changes in serotonin and norepinephrine metabolism on reproductive functions in female rats: An analytical review. *Neurobiol. Aging* 5(2), 121-139
- WETZEL, G (1985): Der Einfluß der Aminosäure L-Tyrosin auf das Fruchtbarkeitsgeschehen beim Rind.
Diss. med. vet., München
- WURTMAN, R.J. (1982): Nährstoffe, die Gehirnfunktionen fördern. *Spektrum der Wissenschaft* 6, 88-101
- WURTMAN, R.J. und J.D. FERNSTROM (1976): Control of brain neurotransmitter synthesis by precursor availability and nutritional state.
Biochem. Pharmacol. 25 (15), 1691-1696

WURTMAN, R.J., M.J. HIRSCH und J.H. GROWDON (1977): Lecithin consumption raises serum-free choline levels.
Lancet 2(1), 68-69

WURTMAN, R.J., F. HEFTI und E. MELAMED (1981): Precursor control of neurotransmitter synthesis.
Pharmacol. Rev. 32 (4), 315-335

ZEISEL, S.H., J.K. BLUSZTAJN und R.J. WURTMAN (1979): Brain lecithin biosynthesis: evidence that bovine Brain can make choline molecules.
In: Barbeau, A., J.H. Growdon und R.J. Wurtman (Hrsg.), Nutrition and the Brain, 5, 47-55
Raven Press, New York

Resumo: Determinação da concentração de fosfatidilcolina em soro bovino durante o ciclo estral.

Na presente pesquisa determinou-se através do "UV-Test-Combination Lecithin", a variação do nível sérico da fosfatidilcolina endógena durante as diferentes fases do ciclo estral de fêmeas bovinas da raça "Deutsches Fleckvieh".

Inicialmente utilizou-se uma vaca em anestro que para indução do cio recebeu um tratamento a base de tirosina. Cinco ciclos estrais regulares foram observados clinicamente, através da palpção retal e da ultrasonografia. Durante este período a concentração da fosfatidilcolina foi determinada diariamente, indicando um aumento do nível sérico da fosfatidilcolina endógena a partir do pro-estro ($1,230 \pm 0,46$ mg/ml) até o estro ($1,642 \pm 0,47$ mg/ml). Após a ovulação, no meta-estro ($0,873 \pm 0,40$ mg/ml) observou-se uma queda na concentração da fosfatidilcolina sérica deste animal e durante o diestro ($1,249 \pm 0,33$ mg/ml) observou-se grande variação entre os valores médios da fosfatidilcolina sérica.

Numa segunda fase, dez vacas nas mesmas condições da anterior, foram sincronizadas com "PRID-Spiral". A concentração da fosfatidilcolina no soro desses animais foi determinada antes, durante e após o estro. Os resultados obtidos foram semelhantes aos descritos anteriormente. O nível de fosfatidilcolina

obtido durante o período ainda sob o efeito da espiral sincronizadora foi em torno de $1,186 \pm 0,36$ mg/ml. No proestro caiu para $0,786 \pm 0,44$ mg/ml, para elevar-se no estro a $1,389 \pm 0,73$ mg/ml de fosfatidilcolina no soro. Após a ovulação observou-se novamente uma queda da concentração da fosfatidilcolina no soro desses animais em torno de $1,017 \pm 0,62$ mg/ml.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a fosfatidilcolina como precursora da acetilcolina, apresenta variação do seu nível sérico durante as diferentes fases do ciclo estral e que essa oscilação também pode ser correlacionada com a concentração de outros aminoácidos no soro, os quais são de importância na síntese de neurotransmissores.

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. M. Rüsse aussprechen für die freundliche Aufnahme in der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik und für die Überlassung des Themas, sowie seiner jederzeit gewährten Unterstützung bei der Durchführung dieser Untersuchungen.

Den Angehörigen des Institutes danke ich sehr, besonders Herrn Dr. J. Hammerl und Frau M. Scheidter für die gewährte Hilfe, sowie für die exzellente Mitarbeit bei der Fertigstellung dieser Dissertation. Außerdem danke ich Herrn Dr. O. Beutler und Frau Dr. A. Krause von Boehringer Mannheim-Tutzing für die praktischen Labor-Hinweise und die kostenlosen Reagentien.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), der Brasilianischen Regierung (CAPES) und der Universität Federal Fluminense (UFF) danke ich für die großzügige Bereitstellung des Stipendiums und der finanziellen Unterstützung.

Mein Dank geht auch an mehrere Personen aus Brasilien und Deutschland, die mir ihre bereitwillige, freundschaftliche und verständnisvolle Unterstützung während meines Aufenthaltes in Deutschland gegeben haben. Hier insbesondere gilt mein herzlicher Dank Frau Dr. Y. Costa, Herrn Dr. W. Tauber und Frau H. Wahre.

LEBENS LAUF

Marcio Ricardo Costa Dos Santos

geboren am 18.04.50 in Niterói - Rio de Janeiro Stadt,
Brasilien.

Eltern: Ricardo Lima Dos Santos und Dionísia Costa Dos Santos.

- 1957-59 Besuch der Grundschule "Curso Marília Mattoso".
- 1960-68 Gymnasium "Centro Educacional de Niterói".
- 1969-72 Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen
Fakultät der Universität Federal Fluminense (UFF),
Brasilien.
- 1972 Approbation als Tierarzt.
- 1974-76 Postgraduiertenstudium zur Erlangung des Grades
eines "Master of Science" an der Tierärztlichen
Fakultät der UFF. Inaugural Dissertation: "Patho-
logie der Hoden und Nebenhoden von Ziegenböcken in
Rio de Janeiro Stadt, Brasilien".
- 1976-77 Spezialisierung im Bereich Theriogenology (Resi-
dent in Reproductive Pathology) an dem New York
State College of Veterinary Medicine der Cornell
Universität, USA, als Stipendiat von "Rotary Foun-
dation of Rotary International".
- 1978 Approbation als Assistenzprofessor an der UFF.
- 1978-82 Lehrtätigkeit an der Tierärztlichen Fakultät der
UFF, Lehrstuhl für Physiopathologie der Fort-
pflanzung - insbesondere Gynäkologie und Geburts-
hilfe des Tieres.
- 1983 Beginn an der Gynäkologischen und Ambulatorischen
Tierklinik der Universität München mit der Durch-
führung einer Dissertation als Stipendiat des
Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD).

